

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620081151605

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂分批发酵过
程的动力学模型及补料分批培养

Kinetic Models for the Batch Fermentation of Biofloculant by
Corynebacterium glutamicum and the Fed-batch Culture Process

安 仲 涛

指导教师姓名: 何 宁 副 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2011 年 7 月

论文答辩日期: 2011 年 8 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

生物絮凝剂是由藻类、细菌、真菌和酵母菌等微生物分泌的胞外聚合物，对液体中悬浮颗粒和胶体粒子具有絮凝作用。与传统的化学合成絮凝剂相比具有安全、无毒、生物可降解，使用无二次污染等优点。利用大规模的微生物培养可以实现生物絮凝剂的高效生产，在给水处理、医药、食品等领域具有极广阔的应用前景。

本研究承接前期研究结果，在初始葡萄糖浓度为 $10.0\text{--}17.5\text{ g L}^{-1}$ 范围内，对谷氨酸棒杆菌分批发酵生产生物絮凝剂过程的动力学模型进行了研究。建立了Lorentzian函数修饰的Logistic方程菌体生长模型，时间修正因子 t_d 修正的Luedeking-Piret产物生成模型以及Luedeking-Piret-like葡萄糖和尿素消耗模型。模拟验证结果表明，以上四个模型能够较好描述不同初始葡萄糖浓度下谷氨酸棒杆菌分批发酵生产生物絮凝剂过程的菌体生长、产物生成以及葡萄糖和尿素消耗状况，并能较好地对发酵过程进行预测。

根据动力学模型所获得的发酵过程信息以及前期溶氧水平对生物絮凝剂合成影响的研究结果，对生物絮凝剂的补料分批培养进行了研究。采用一次补料策略，即发酵9 h时同时补加浓度为 30 g L^{-1} 的葡萄糖溶液95 mL和浓度为 16 g L^{-1} 的尿素溶液19 mL，发酵结束时菌体干重达到 2.33 g L^{-1} ，比分批培养过程提高了23.94%，生物絮凝剂产量为 34.68 mg L^{-1} ，比分批培养过程略低；采用两次补料策略，即发酵6 h时补加浓度为 30 g L^{-1} 的葡萄糖溶液57 mL和浓度为 16 g L^{-1} 的尿素溶液19 mL，发酵11 h时补加浓度为 30 g L^{-1} 的葡萄糖溶液76 mL和浓度为 16 g L^{-1} 的尿素溶液34 mL，发酵结束时菌体干重为 2.06 g L^{-1} ，生物絮凝剂产量 43.68 mg L^{-1} ，比分批发酵过程分别提高了9.57%和24.76%；采用三次补料策略，即发酵6 h时补加浓度为 60 g L^{-1} 的葡萄糖溶液28.5 mL和浓度为 32 g L^{-1} 的尿素溶液14.25 mL，发酵10 h时补加浓度为 60 g L^{-1} 的葡萄糖溶液95 mL和浓度为 32 g L^{-1} 的尿素溶液47.5 mL，发酵19 h时补加浓度为 60 g L^{-1} 的葡萄糖溶液95 mL和浓度为 32 g L^{-1} 的尿素溶液47.5 mL，同时维持发酵过程通气量 $2\text{ L L}^{-1}\text{min}^{-1}$ ，发酵31 h后停止搅拌直至发酵结束，最终菌体干重达 2.23 g L^{-1} ，生物絮凝剂产量 176.32 mg L^{-1} ，比分批培养过程菌体干重和絮凝剂产量分别提高了18.62%和403.63%。

关键词：谷氨酸棒杆菌；生物絮凝剂；分批发酵；动力学；补料分批培养

Abstract

Bioflocculant (microbial flocculant), secreted by certain algae, bacteria, fungi as well as yeast, is extracellular biopolymer, which is able to induce solid particles, cells and colloidal particles in a liquid suspension to flocculate. Contrasted with traditional chemosynthetic flocculant, bioflocculant is harmless and biodegradable with less secondary pollution. Bioflocculant is expected to be adopted in a variety of industrial processes such as wastewater treatment, drinking water purification, downstream processes in medicament production, food processing and fermentation processes.

Based on our previous research, kinetic models were further developed for the batch fermentation of bioflocculant production by *Corynebacterium glutamicum* at various initial glucose concentration from 10.0 to 17.5 g L⁻¹. Lorentzian model modified Logistic equation was applied to describe the cell growth, time-corrected Luedeking-Piret and Luedeking-Piret-like models were established to describe bioflocculant synthesis and glucose/urea consumption. The results showed that the kinetic models could well describe and predict the batch culture process of *C. glutamicum* in bioflocculant production at various initial glucose concentrations from 10.0 to 17.5 g L⁻¹.

According to the prediction results from kinetic models, the fed-batch strategy of bioflocculant production by *Corynebacterium glutamicum* was studied. (1) one-stage glucose+urea fed-batch culture process: feeding with 30 g L⁻¹ glucose solution (95 mL) and 16 g L⁻¹ urea solution (19 mL) at 9 h. 34.68 mg L⁻¹ of bioflocculant was obtained and the biomass concentration was elevated to 2.33 g L⁻¹, 23.94% higher than that of the batch process. (2) two-stage glucose+urea fed-batch culture process: feeding with 30 g L⁻¹ glucose solution (57 mL) and 16 g L⁻¹ urea solution (19 mL) at 6 h. and 30 g L⁻¹ glucose solution (76 mL) and 16 g L⁻¹ urea solution (34 mL) at 11 h. A biomass of 2.06 g L⁻¹ was obtained while the bioflocculant concentration was enhanced to 43.68 mg L⁻¹, which were 9.57% and 24.76% higher than those of the batch process. (3)

three-stage glucose+urea fed-batch culture process: feeding with 60 g L⁻¹ glucose solution (28.5 mL) and 32 g L⁻¹ urea solution (14.25 mL) at 6 h and 60 g L⁻¹ glucose solution (95 mL) and 32 g L⁻¹ urea solution (47.5 mL) at 10 h and 60 g L⁻¹ glucose solution (95 mL) and 32 g L⁻¹ urea solution (47.5 mL) at 19 h. During this process, the agitation was stopped after 31 h till the culture finished and the aeration rate was kept at 2 L L⁻¹ min⁻¹ throughout the process. Results showed that a biomass of 2.23 g L⁻¹ was obtained and the bioflocculant concentration was enhanced to 176.32 mg L⁻¹, 18.62% and 403.63% higher than those of the batch process, respectively.

Key words: kinetics; *Corynebacterium glutamicum*; bioflocculant; batch fermentation; fed-batch fermentation

目录

第一章 文献综述	1
1.1 生物絮凝剂发酵生产研究状况	1
1.1.1 生物絮凝剂生产菌	1
1.1.2 生物絮凝剂的化学组成与性质	3
1.1.3 生物絮凝剂的发酵生产	3
1.1.4 生物絮凝剂的应用	4
1.1.5 谷氨酸棒杆菌生产生物絮凝剂的研究状况	6
1.2 生物絮凝剂的分批发酵过程动力学模型研究状况	6
1.2.1 菌体生长动力学模型研究状况	7
1.2.2 产物生成动力学模型研究状况	8
1.2.3 底物消耗动力学模型研究状况	9
1.3 本论文的研究意义及内容	9
第二章 实验材料与方法	11
2.1 材料与仪器	11
2.1.1 菌种	11
2.1.2 培养基	11
2.1.3 主要原料与试剂	11
2.1.4 主要仪器与设备	11
2.2 方法与条件	11
2.2.1 培养条件	11
2.2.2 菌体生长量测定	12
2.2.3 生物絮凝剂含量测定	12
2.2.4 葡萄糖浓度测定	13
2.2.5 尿素浓度测定	14
2.2.6 数据处理方法	14
第三章 分批发酵过程动力学模型	15
3.1 引言	15
3.2 菌体生长动力学模型	15
3.2.1 谷氨酸棒杆菌分批发酵过程菌体生长状况	15
3.2.2 Logistic 方程模型	16
3.2.3 Lorentzian 函数模型的建立	18
3.2.4 菌体生长模型	19
3.3 产物生成动力学模型	21
3.3.1 时间修正因子 t_d 修正的 Luedeking-Piret 模型的建立	21
3.3.2 时间修正因子 t_d 修正的 Luedeking-Piret 模型的模拟验证	23
3.4 底物消耗动力学模型	24
3.4.1 Luedeking-Piret-like 葡萄糖消耗动力学模型的建立	24
3.4.2 Luedeking-Piret-like 葡萄糖消耗动力学模型的模拟验证	24
3.4.3 Luedeking-Piret-like 尿素消耗动力学模型的建立	25

3.4.4 Luedeking–Piret-like 尿素消耗动力学模型的模拟验证.....	26
3.5 动力学模型的模拟预测	27
3.5.1 菌体生长模拟预测.....	27
3.5.2 产物生成及底物消耗模拟预测.....	29
3.5.3 菌体生长模拟预测的生长速率及比生长速率曲线.....	31
3.6 本章小结	34
第四章 补料分批培养	35
4.1 引言	35
4.2 发酵罐分批培养	35
4.3 补料的依据及补料方案	36
4.3.1 补料的依据.....	36
4.3.2 一次补加葡萄糖尿素补料分批培养.....	37
4.3.3 两次补加葡萄糖尿素补料分批培养.....	37
4.3.4 三次补加葡萄糖尿素控制搅拌转速补料分批培养.....	38
4.3 本章小结	40
第五章 结论与建议.....	41
5.1 结论	41
5.2 建议	42
参考文献.....	44
附录.....	48
在读期间发表的文章.....	69
致谢	70

Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research status quo of bioflocculant production	1
1.1.1 Bioflocculant-producing microorganisms	1
1.1.2 Chemical structures and properties of bioflocculants	3
1.1.3 Production and purification of bioflocculants	3
1.1.4 Application of bioflocculants	4
1.1.5 Research status quo of bioflocculant production by <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
1.2 Research status quo of kinetic models for batch fermentation of bioflocculant	6
1.2.1 Research status quo of cell growth models	7
1.2.2 Research status quo of production models	8
1.2.3 Research status quo of substrate consumption models	9
1.3 Significance and contents of this thesis	9
Chapter 2 Materials, equipments and methods	11
2.1 Materials and equipments	11
2.1.1 Microorganism	11
2.1.2 Media	11
2.1.3 Materials and reagents	11
2.1.4 Apparatus and equipments	11
2.2 Methods and conditions	11
2.2.1 Cultivation conditions	11
2.2.2 Determination of biomass	12
2.2.3 Determination of bioflocculant concentration	12
2.2.4 Determination of glucose concentration	13
2.2.5 Determination of urea concentration	14
2.2.6 Data processing method	14
Chapter 3 Kinetic models for batch fermentation of <i>C. glutamicum</i>	15
3.1 Introduction	15
3.2 Cell growth model	15
3.2.1 Biomass concentration of the batch fermentation by <i>Corynebacterium glutamicum</i>	15
3.2.2 Logistic model	16
3.2.3 Lorentzian function model	18
3.2.4 Cell growth model	19
3.3 Production formation model	21
3.3.1 Establishment of time-corrected modified Luedeking-Piret model	21
3.3.2 Simulation of time-corrected modified Luedeking-Piret model	23

3.4 Substrates consumption models	24
3.4.1 Establishment of Luedeking–Piret-like glucose consumption model.....	24
3.4.2 Simulation of Luedeking–Piret-like glucose consumption model.....	24
3.4.3 Establishment of Luedeking–Piret-like urea consumption model.....	25
3.4.4 Simulation of Luedeking–Piret-like urea consumption model.....	26
3.5 Prediction by kinetic models for batch fermentation of <i>C. glutamicum</i>	27
3.5.1 Prediction of cell growth.....	27
3.5.2 Prediction of production formation and substrate consumption.....	29
3.5.3 Cell growth rate and specific cell growth rate of cell growth prediction	31
3.6 Summary	34
Chapter 4 Fed-batch culture of bioflocculant production	35
4.1 Introduction	35
4.2 Batch culture	35
4.3 Basis and program of feeding	36
4.3.1 Basis of feeding.....	36
4.3.2 One-stage glucose+urea fed-batch culture.....	37
4.3.3 Two-stage glucose+urea fed-batch culture.....	37
4.3.4 Three-stage glucose+urea fed-batch culture with stirring controlled.....	38
4.3 Summary	40
Chapter 5 Conclusions and suggestions	41
5.1 Conclusions	41
5.2 Suggestions	42
References	44
Appendixs	48
Publications during graduate study	69
Acknowledgement	70

第一章 文献综述

1.1 生物絮凝剂发酵生产研究状况

生物絮凝剂（微生物絮凝剂）是由藻类、细菌、真菌和酵母菌等微生物分泌的胞外生物聚合物，对液体中悬浮颗粒和胶体粒子具有絮凝作用，其主要活性成分为糖蛋白、糖脂、多糖、蛋白质、脂质和 DNA 等，尽管性质各异，却都是分子量高于 10^5 以上的生物大分子^[1,2,3]。微生物絮凝剂与传统的化学絮凝剂相比具有安全、无毒、生物可降解、使用无二次污染的特点^[4,5,6,7,8]，在给水处理、医药、食品等领域具有极广阔的应用前景^[9]。

1876 年 Louis Pasteur 发现 *Levure casseuse* 酵母菌产生絮凝剂，这也是第一例微生物体系产生絮凝剂的报道^[10]；1935 年 Butterfield 从活性污泥中分离得到一株产絮凝剂的动胶菌属细菌^[11]。此后，生物絮凝剂被广泛进行研究，生物絮凝剂积累和生物细胞聚集之间的相互关系也被建立起来^[5]。自从 20 世纪 70 年代，日本在生物絮凝剂这一领域的研究工作一直处于遥遥领先的地位。1976 年 Nakamura 等^[12]筛选出 *Streptomyces Vinaceus*、*Corynebacterium brevicale*、*Pseudomonas fluorescent* 等 19 种具有絮凝能力的微生物；1977 年 Kurane 等^[13]在研究酞酸酯生物降解过程中发现了具有絮凝作用的微生物培养液，随后筛选出絮凝效果最佳的 *Rhodococcus erythropolis*，并对絮凝剂特性、培养条件等进行了研究，由此制成了 NOC-1 型微生物絮凝剂^[14,15]。

我国从 20 世纪 80 年代以来开展了对微生物絮凝剂的研究，90 年代后期研究开始进入高潮^[16]。

1.1.1 生物絮凝剂生产菌

产生生物絮凝剂的微生物种类繁多，包括藻类、细菌、真菌和酵母菌等，这些微生物大多从土壤、城市下水道、河底污泥、污水处理厂活性污泥中筛选分离得到，资源及其丰富。现将目前已报道的部分产生生物絮凝剂的微生物归结如表 1-1。

表 1-1 目前已报道的部分产生生物絮凝剂的微生物

Table 1-1 Some of the reported bioflocculant-producing microorganisms

微生物	报道者及年份
<i>Anabaenopsis circularis</i>	Levy N et al., 1992 ^[17]
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Deng S B et al., 2005 ^[18]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	康建雄 等, 2005 ^[19]
<i>Bacillus circulans</i>	Li Z et al., 2009 ^[20]
<i>Chryseobacterium daeguense</i>	Liu W J et al., 2010 ^[21]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	He N et al., 2004 ^[22]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Lu W Y et al., 2005 ^[8]
<i>Enterococcus cecorum</i>	刘占英 等, 2007 ^[23]
<i>Geotrichum candidum</i>	万鹰昕 等, 2008 ^[24]
<i>Gyrodinium impudicum</i>	Yim J H et al., 2007 ^[25]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kobayashi T et al., 2002 ^[26]
<i>Kluyveromyces cryocrescens</i>	Kakii K et al., 1990 ^[27]
<i>Lactobacillus</i>	秦培勇 等, 2004 ^[28]
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Zhang T et al., 1999 ^[29]
<i>Mycobacterium phlei</i>	Misra M et al., 1993 ^[30]
<i>Nocardia amarae</i>	Takeda M et al., 1992 ^[31]
<i>Nocardia calcarea</i>	Zhang T et al., 1999 ^[29]
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Gong XY et al., 2003 ^[32]
<i>Proteus mirabilis</i>	Xia S Q et al., 2008 ^[33]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	毛艳丽 等, 2008 ^[34]
<i>Rhizobium radiobacter</i>	Wang W et al., 2008 ^[35]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kurane R et al., 1991 ^[36] , 1994 ^[37]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sousa M J et al., 1992 ^[38]
<i>Serratia ficaria</i>	Gong W X et al., 2008 ^[39]
<i>Sorangium cellulosum</i>	Zhang J et al., 2002 ^[29]
<i>Streptomyces griseus</i>	Shimofuruya H et al., 1996 ^[40]

1.1.2 生物絮凝剂的化学组成与性质

不同的微生物产生的生物絮凝剂的种类是不同的，生物絮凝剂大多为机能性多糖类和机能性蛋白质类物质，另外还有少量属于脂类和 DNA 等其它类型，Kurane 等^[41]利用 R-3 混合菌：*Oerskovia* sp. KYM-7, *Acinetobacter* sp. KYM-3, *Agrobacterium* sp. KYM-4 及 *Enterobacter* sp. KYM-5 发酵获得的生物絮凝剂经检测为酸性多糖，相对分子量大于 2×10^6 Da；Shih 等^[42]研究发现 *Bacillus licheniformis* 产生的絮凝剂为谷氨酸聚合物，Liu 等^[21]培养 *Chryseobacterium daeguense* 产生的絮凝剂含蛋白质 32.4%，多糖 13.1%，核酸 6.8%，另外还有羧基、羟基、甲氧基等基团存在。

1.1.3 生物絮凝剂的发酵生产

我国微生物絮凝剂的研制和应用大部分还处于实验室研究阶段，真正应用于工程实际的较少^[16]。生产成本过高一直成为阻碍其推广的主要原因，对一般的絮凝剂产生菌来讲，最佳碳源通常为葡萄糖和果糖，最适氮源通常为酵母膏、牛肉膏、酪蛋白和酪氨酸，这些原材料的使用使絮凝剂的合成成本大幅提高^[43]。

为了降低生物絮凝剂合成成本，必须寻找廉价原料代替高价原料，开发低成本培养基，这也成为近几年国内外众多絮凝剂工作者的主要研究目标。

王丽丽等^[44]利用廉价的制酒废水培养基对 HJ4 菌株进行发酵培养，所得絮凝剂对高岭土悬浊液的絮凝率为 90.44%，每升发酵液可获得絮凝剂 3.85 g；You 等^[45]利用发酵生产氢气的发酵废水生产生物絮凝剂，菌株 *Bacillus subtilis* BF-6 产生的生物絮凝剂的得率为 2.1 g L^{-1} ；刘立凡等^[46]在不加入其他营养成分的条件下将糖蜜废液稀释 50 倍，初始 pH 调整为 5，培养 3 d 可得到微生物絮凝剂粗品的产量为 3.1 g L^{-1} ；Wang 等^[47]把 *Klebsiella mobilis* 接种到添加 2%乙醇(v/v)的乳业废水中生产新型生物絮凝剂，在优化的条件下得到 2.58 g L^{-1} 的粗制品，絮凝活性为 95.4%；敖黎鑫^[48]利用猪粪水替代絮凝菌 HF-8 的培养基，在 COD 浓度为 1000 mg L^{-1} 的 1 L 猪粪水中，添加 4 g 葡萄糖和 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为外加碳源和外加氮源，然后将初始 pH 调整为 7，发酵培养 48 h 制备的絮凝剂 HF-8 对高岭土悬液的絮凝率达到 93.21%，其生产成本相当于传统培养基的 20%左右；Patil 等^[49]研究 *Azotobacter indicus* ATCC 9540 生产生物絮凝剂时发现在 Ashby's 培养

基中添加 20 g L^{-1} *Madhuca latifolia* L 花提取物和 0.5 g L^{-1} 酵母膏, 转速为 180 r min^{-1} 、温度 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 发酵 144 h 得到生物絮凝剂的最大产量 6.10 g L^{-1} , 认为 *Madhuca latifolia* L 花提取物是生产生物絮凝剂的潜在生物资源。

人类对微生物的利用经历了天然混合培养和纯种培养两个阶段。但是, 在长期的生产实践中人们发现, 单株微生物的发酵存在目标产物转化效率低, 培养条件要求严格和对环境因素适应性差等缺陷, 必须依靠两种或两种以上的微生物共同培养才能完成, 混合菌资源已逐渐被人们所重视^[50]。

不同的微生物菌群混合培养产生的相互作用对微生物细胞的聚集、絮凝剂的产生以及廉价培养基原料的利用具有积极的意义。早在 1994 年, Kurane 和 Matsuyama^[41]就报道了单独培养不能产生絮凝剂的厄式菌属 *Oerskovia*、不动细菌属 *Acinetobacter*、土壤杆菌属 *Agrobacterium* 和肠杆菌属 *Enterobacter* 的四种微生物混合培养通过他们之间的相互作用产生絮凝剂的事实; 芦艳等^[51]以啤酒废水为廉价培养基, 不外加碳源和氮源只添加质量分数为 0.5% 的 KH_2PO_4 , 对复合菌 M1-2 进行培养, 所产絮凝剂对高岭土悬浊液 (质量浓度 50 g L^{-1}) 的絮凝率为 95.0%; 任宏洋等^[52]利用酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*) 和毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*) 复合菌将酱油酿造废液稀释 1 倍加入 5 g L^{-1} 乙醇作为补充碳源生产生物絮凝剂, 生物絮凝剂的产量可达到 5.92 g L^{-1} ; 马放等^[53]首先通过纤维素降解菌 HIT-3 对稻草秸秆进行生物降解, 再使产絮菌 F2-F6 利用秸秆糖化液进行发酵的两阶段发酵工艺制备复合型生物絮凝剂, 每吨稻草秸秆可以制取生物絮凝剂 44 kg。

1.1.4 生物絮凝剂的应用

1.1.4.1 在水处理中的应用

化学絮凝法普遍使用于治理洗羊毛生产工艺中排放的高浓度有机废水。但是, 化学絮凝法在实际运行中存在去除率低、投药量大、运行不稳定、出水受加药影响的问题。林俊岳等^[54]用生物絮凝代替化学絮凝, 探索了洗毛废水治理的新方法, 使 COD 的去除率达到 85%, 出水由灰黑色悬浊液变为红褐色透明液体。

罗志华等^[55]将微生物絮凝剂产生单菌 M-3 和 M-2 共同培养, 获取生物絮凝剂处理纸箱厂废水。复合型生物絮凝剂在较少的药剂下获得较好的处理效果。絮

凝率可达 93%，COD 去除率达到 74%，氨氮去除率达到 90%。

王丽丽等^[56]在 100 mL⁻¹ 印染废水中投加 0.12 mg mL⁻¹ 的絮凝剂和 7 mL 浓度为 1% 的 CaCl₂，调整 pH 为 10，使印染废水的浊度、色度及 COD 去除率分别达到 88.72%、91.80%和 52.14%，该研究结果为生物絮凝剂的工业化生产及其在印染废水中的应用提供了理论依据。

郭琇和孙洪伟^[57]利用甘蔗渣作为廉价底物，进行复发酵培养获得复合型生物絮凝剂，对降低珠江水的浊度、色度、TP、邻苯二甲酸脂进行了实验。当投加量(液态)为 12 mL L⁻¹ 时，对降低浊度、色度有很好的效果。把微生物絮凝剂制成含水率为 80%左右的干粉，投加量为 0.21 mg L⁻¹ 时对 TP、邻苯二甲酸脂有较稳定的处理效果。

龚良玉等^[58]利用一株假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)的发酵液研究了该细菌产生的絮凝剂对东海原甲藻和裸甲藻的絮凝去除作用。结果表明，该生物絮凝剂可有效絮凝去除这两种赤潮生物，并且随絮凝剂用量的增加以及作用时间的延长去除效果逐渐增加至最大，并基本保持恒定。生物絮凝剂有效去除赤潮生物的体积浓度为 4.0%~10.0%，有效絮凝作用时间为 1.5 h 左右。絮凝效率还与体系的离子强度相关，pH 在 8.0 左右絮凝效率较高，不同浓度的 Ca²⁺、Mg²⁺对絮凝除藻作用有一定的增效作用，Ca²⁺、Mg²⁺的最佳助凝离子浓度分别为 2.0 mmol L⁻¹ 及 4.0 mmol L⁻¹。

孟路等^[59]针对传统无机铝盐絮凝剂在处理低温低浊水时残余铝过高的问题，采用中试装置应用复合型生物絮凝剂(CBF)处理北方地区冬季低温低浊水源水，对残余铝的去除达到了很好的效果。在与聚合氯化铝铁复配进行强化混凝的试验当中，混凝效果提高 36.1%，聚合氯化铝铁总投药量降低了 15%，并且消除了聚合氯化铝铁(PAFC)导致的残余铝升高的现象，出水残余铝浓度仅为 0.016 mg L⁻¹。

1.1.4.2 食品工业中的应用

淀粉厂是食品行业的典型企业，解决淀粉废水的处理问题具有重要意义。淀粉厂在进行淀粉麸质分离后水中仍含有细小的悬浮麸质颗粒以及溶解性蛋白，回收这些物质可作为高蛋白饲料，具有较高的经济价值。邓述波等^[60]从土壤中分离、筛选得到的细菌能够产生高效絮凝剂，用于处理淀粉废水效果良好。

樊萍等^[61]用生物絮凝剂处理啤酒废水，在温度为 40℃，pH 为 7，生物絮凝剂投加量为 0.7 mL 每 50 mL 啤酒废水，经过 5 天处理，啤酒废水 COD 去除率达到 90.53%，絮凝率达到 87.56%，氨氮去除率达到 84.08%。

乳制品废水主要特点是有机物含量较高、易腐败、易导致水体富营养化，直接排放严重污染环境。袁河清等^[62]用生物絮凝剂 MBFGA1 预处理乳制品加工废水(简称废水)。实验结果表明：以 150 r min⁻¹ 的转速搅拌 30 s，再以 30 r min⁻¹ 的转速搅拌 20 min；MBFGA1 的加入量为 15 mg L⁻¹，废水 pH 为 4.0 时，MBFGA1 对废水的絮凝处理效果最好；同时废水温度对浊度、COD 去除率也有一定的影响，在 20~45 ℃时废水浊度的去除率始终保持在 85%以上，30 ℃时 COD 去除率达到最大值 65.0%。

1.1.5 谷氨酸棒杆菌生产生物絮凝剂的研究状况

2002 年，本课题组^[22]从土壤中筛选获得了一株产生生物絮凝剂 REA-11 的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005。

在课题组前期的研究中，生物絮凝剂 REA-11 被证明是一种以半乳糖醛酸为主要结构单元的酸性蛋白聚糖，分子质量约为 10⁵ Da，合成的絮凝剂约 80% 以上分泌至胞外培养基中^[22]。我们对该絮凝剂的代谢途径进行了初步探索，确定了 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖醛酸是生物絮凝剂 REA-11 生物合成支路中 3 种关键中间产物^[63]。在生产菌基本生长代谢特性的基础上，研究了营养条件对生物絮凝剂 REA-11 合成的影响，确定了以蔗糖和玉米浆为主要营养成分的廉价培养基组成，以及有效的分阶段供氧控制策略，实现了高细胞生长速率和高产物产率的统一^[64,65]。利用代谢通量分析方法研究发现，磷酸戊糖途径 (PP) 通量在整个发酵过程中始终维持在较高的水平，REA-11 合成通量随溶氧浓度的增加而降低，相反，菌体合成通量则随溶氧水平的增加而增加^[66]。

1.2 生物絮凝剂的分批发酵过程动力学模型研究状况

细胞反应的定量描述是发酵工艺设计过程中必不可少的工具，其中可以定量的测量细胞如何将其基质转化为产物的定量设计参数——产量和得率，易于从实验数据中推导得到，但它们如何随发酵操作条件变化而变化较难预测，为此需要

对发酵过程建立数学模型^[67]。发酵过程的模型化就是把大量的发酵实验数据以简洁的形式表达出来,易于更深刻地了解微生物复杂代谢的本质,为微生物发酵过程在线控制提供先决条件^[68]。

发酵过程数学模型可分为三类:细胞生长动力学模型、底物消耗动力学模型和产物生成动力学模型。

1.2.1 菌体生长动力学模型研究状况

最简单的菌体生长数学表达式是把细胞反应概括为单一的总反应的“黑箱模型”。大多数简化的模型描述中,假定仅有一种限制性基质,典型的是碳源,比生长速率仅是这一基质浓度的函数。比生长速率和底物浓度的关系可以通过不同形式的动力学方程来描述^[69],其中Monod及Logistic方程最为简单和常用^[71],以下对这两种模型作较为详尽的阐述。

Monod 方程作为描述菌体生长的经验模型最早在 1949 年提出,它反映的是菌体生长速率与限制性基质浓度的关系,不考虑菌体浓度增加对菌体生长的抑制作用,主要用来描述非抑制性单一底物限制情形下的细胞生长^[71]。Monod 方程

的动力学表达式为: $\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{C_s + K_s}$, 该模型的特点是,当限制性底物浓度为零时生长速率为零,当限制性底物过剩时生长速率趋于最大,而且无论底物浓度多高,细胞最终都会以最大比速率生长^[72]。但是实际发酵过程中高浓度的糖、盐、酸以及许多细胞的代谢产物等都会抑制细胞的生长^[67]。

Logistic方程由Verhulst (1845, 1848)首次提出用于描述人口增长,之后由Pearl和Reed (1920) 处于描述人口增长的相同目的再次被提出^[71]。Logistic方程

的动力学表达式为: $\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X (1 - \frac{X}{X_{\max}})$, Logistic方程是一个底物依赖的非结构模型,能够很好的描述分批发酵过程中菌体自身对生长的抑制作用^[73]。菌体生长速率取决于用于菌体生长的底物浓度,当限制性底物浓度降低时,菌体生长便接近最大值, Logistic方程已经广泛的用于描述菌体的生长过程^[71]。

在生物絮凝剂生产过程动力学研究中,康建雄等^[19]、崔玉海^[68]分别在研究出芽短梗霉合成生物絮凝剂普鲁兰的发酵过程菌体生长动力学模型时,采用

Logistic方程对实验数据进行拟合；刘占英等^[23]在研究絮凝天然碱碱泥的生物絮凝剂产生菌分批发酵动力学模型中，细胞生长动力学采用Logistic方程、Gompertz方程和Richards方程进行描述，三个模型对实验数据的拟合效果都较好，但Logistic方程参数少且具有物理意义，故最终采用Logistic方程作为细胞生长的模型；王雪^[74]在复合型生物絮凝剂产生菌F2-F6发酵动力学研究中，菌体生长模型也是用Logistic方程进行拟合。前期研究中^[75]，采用Logistic方程模拟*C. glutamicum*合成蛋白聚糖类生物絮凝剂的分批发酵菌体生长过程，而且能根据初始菌体浓度的不同在模型实验底物浓度下对絮凝剂的分批发酵菌体生长过程进行模拟预测。

1.2.2 产物生成动力学模型研究状况

在微生物发酵过程中产物的基本形式可以分为两类：细胞产能而形成的产物，如CO₂、水及简单的碳水化合物乙醇、乳酸等；合成过程需要能量的产物，如多糖、抗生素、胞外酶等。对第一类产物，Luedeking和Piret提出了如下经验方程式： $r_{ps} = \alpha r_x + \beta X_v$ （式中 α 、 β 是常数），Luedeking-Piret模型是生长偶联和非偶联的混合型，称为混合模型或部分相关模型。对第二类产物，可以采用简单的一级动力学表达式： $r_{pc} = \beta X_v$ ，称为生长非偶联型；当产物生成速率与细胞生长成正比时，可以采用生长偶联型表达式： $r_{pc} = \alpha r_x$ ^[67]。

康健雄等^[19]认识到普鲁兰多糖的发酵属于部分生长偶联型，采用Luedeking-piret方程描述胞外多糖产物的比生成速率与菌体比生长速率的关系；刘占英等^[23]在研究絮凝天然碱碱泥的生物絮凝剂产生菌分批发酵动力学模型中，细胞生长和产物生成的关系属于部分关联型，采用Luedeking-Piret方程 $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$ ， $P=C(1)+C(2)\lg t+C(3)\lg^2 t$ 和 $P=C(1)+C(2)t+C(3)\exp(C(4)t)$ 对絮凝剂生成的数据进行拟合，经过比较发现三者拟合效果都很好，但是Luedeking-Piret方程考虑了菌量及菌体生长对产物的影响，另外两个方程只考虑了产物生成与时间的关系，所以最终采用Luedeking-Piret方程描述产物的合成；王雪^[74]由絮凝剂产生曲线和菌体生长曲线的关系得知复合型絮凝剂的产生与混合菌F2-F6部分相关，选用Luedeking-Piret方程描述产物生产过程。前期研究中^[75]，尝试采用Luedeking-Piret方程对絮凝剂的整个发酵过程进行模拟（以絮凝

剂活性高低表征絮凝剂生成量多少），虽然初期阶段（<16 h）模拟效果有所提高（ $R^2=0.9326$ ），但进入对数期，即生物絮凝剂的大量积累期后，Luedeking-Piret 方程的模拟效果很差。最终选择修正的 Gaden 生长相关模型用以描述谷氨酸棒杆菌分批发酵合成生物絮凝剂过程。

1.2.3 底物消耗动力学模型研究状况

在微生物发酵过程中碳源是多数细胞和生物产品的主要组成部分，也是细胞内发生的生化反应的主要能源。碳源主要用于：以一定速率合成新的细胞物质及提供合成过程所需的能量；以一定速率合成所分泌的复杂生化物质及提供合成过程所需的能量；以一定速率提供细胞维持代谢需要的能量^[67]。

大多数报道的底物消耗模型是在此基础上根据各自的发酵过程，省略影响较小的部分建立起来，如：刘占英等^[23]在研究絮凝天然碱碱泥的生物絮凝剂产生菌分批发酵动力学模型中，由于产物的生产属于部分生长相关型，所以基质的

消耗速率可以表示为： $\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt}$ ；康建雄等^[19]、崔玉海^[68]各自对碳源消耗

进行分析，建立了出芽短梗霉生成生物絮凝剂普鲁兰底物消耗动力学模型，对玉米淀粉水解物消耗的特征进行描述；王雪^[74]在混合菌絮凝剂发酵生产建模中，发现菌体的生长和絮凝剂的积累主要依赖于基质葡萄糖消耗所提供的能量，而生产菌自身正常基础代谢的能量消耗较小，故为简化，只考虑菌体生长和产物积累对葡萄糖的消耗。前期研究中^[75]，忽略维持菌体代谢的葡萄糖消耗和只考虑菌体生长对尿素的消耗，建立起了葡萄糖消耗模型和尿素消耗模型。

1.3 本论文的研究意义及内容

在前期的研究过程中，我们建立了 Logistic 方程菌体生长模型、时间修正因子 t_d 修饰的 Gaden 生长相关模型及底物消耗模型，四个模型能够较好地模拟和预测不同初始菌浓下 *C. glutamicum* 合成生物絮凝剂的分批发酵过程，但是，这些模型的使用范围很窄，仅仅适用于相同初始葡萄糖浓度下的絮凝剂发酵过程，对于不同初始葡萄糖浓度下的发酵过程并不适用，从而限制了动力学模型的应用。

本研究为扩大 Logistic 方程模型的应用范围,利用最大菌浓 $C_{x,max}$ 与初始葡萄糖浓度的函数方程修饰 Logistic 方程,使之能够模拟不同初始葡萄糖浓度下谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂 REA-11 的分批发酵菌体生长过程。同时在菌体生长模型的基础上建立起产物生成、葡萄糖消耗和尿素消耗模型。进而根据动力学模型所提供的预测信息,尝试采用补料的方式提高生物絮凝剂的合成浓度。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库